

阴地蕨粗多糖对细菌和肿瘤细胞增殖的抑制作用

周施雨^{1a,2}, 钱志萍^{1b}, 曹东东^{1a}, 於俊杰^{1a}, 游蕤翔^{1a}, 戴锡玲^{1a,①}

(1. 上海师范大学: a. 生命科学学院, b. 环境与地理科学学院, 上海 200234; 2. 上海市第一人民医院, 上海 200080)

Inhibition effects of crude polysaccharides from *Botrychium ternatum* on bacteria and proliferation of tumor cells
ZHOU Shiyu^{1a,2}, QIAN Zhiping^{1b}, CAO Dongdong^{1a}, YU Junjie^{1a}, YOU Ruixiang^{1a}, DAI Xiling^{1a,①} (1. Shanghai Normal University: a. College of Life Sciences, b. School of Environmental and Geographical Sciences, Shanghai 200234, China; 2. Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(4): 69-71

Abstract: Crude polysaccharides were extracted from the whole plant of *Botrychium ternatum* (Thunb.) Sw. by using water extraction and ethanol precipitation method, and their inhibition effects on bacteria and proliferation of tumor cells were analyzed. The results show that the yield of crude polysaccharides from the whole plant of *B. ternatum* is 7.05%, and polysaccharides content in crude polysaccharides is 20.60%. Crude polysaccharides from *B. ternatum* show a certain inhibition effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and that on *E. coli* is stronger than that on *S. aureus*, and the minimum inhibitory concentration is 0.206 and 0.309 mg · mL⁻¹, respectively; crude polysaccharides from *B. ternatum* also show an inhibition effect on proliferation of A-549 and Hela cells, and that on proliferation of Hela cell is stronger than that on A-549 cell, the semi-inhibitory concentration is 138.90 and 109.23 μg · mL⁻¹, respectively. Inhibition effects of crude polysaccharides from *B. ternatum* on bacteria and proliferation of tumor cells are all evidently smaller than those of several positive control, but show a tendency to gradually increase with the increase of mass concentration, and a certain concentration dependence.

关键词: 阴地蕨; 粗多糖; 抑菌作用; 肿瘤细胞增殖

Key words: *Botrychium ternatum* (Thunb.) Sw.; crude polysaccharides; bacteriostasis; proliferation of tumor cells

中图分类号: Q949.95; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)04-0069-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.04.09

近年来,蕨类植物的有效成分研究备受人们关注,药用蕨类植物含有黄酮类、酚酸类、萜类、生物碱和多糖等化学成分^[1];其多糖除了参与构成细胞壁和储藏营养外,还具有提高免疫力、抗菌和抗癌的功效^[2-3]。

阴地蕨(*Botrychium ternatum* (Thunb.) Sw.)隶属于阴地蕨科(Botrychiaceae)阴地蕨属(*Botrychium* Sw.),为传统药用植物,全草入药,具有清热解毒、平肝息风、止咳、止血和明目去翳的功效^[4-5]。近年来,已有学者对阴地蕨中的黄酮类和酚酸类成分的生物活性进行了研究^[6-8],但对于其多糖成分的生物活性尚缺乏全面的了解,仅曹剑锋等^[9]就阴地蕨多糖对小鼠结肠癌、红白血病以及小鼠血液细胞等生物活性进行了研究。

鉴于此,作者采用水提醇沉法从阴地蕨全草中提取粗多糖,并分析其抑菌和抑制肿瘤细胞增殖的作用,以期阐明阴地蕨多糖成分的生物活性,为阴地蕨多糖的开发和利用提供基础研究数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试阴地蕨全草于2016年12月采自湖北随州,采集生长状况良好的植株,晾干后切段,用粉碎机研磨成粉末,供试。大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均由上海市第一人民医院检验科提供;人宫颈癌细胞(Hela)和人肺癌细胞(A-549)均购自美国模式培养物集存库(ATCC)。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线绘制以及粗多糖提取和多糖含量测定 配制质量浓度0.2 mg · mL⁻¹葡萄糖标准液并进行梯度稀释,采用苯酚-硫酸法^[10]测定波长490 nm处吸光度,绘制葡萄糖标准曲线 $Y=21.552 0X-0.453 8$ ($R^2=0.963 3$,线性范围为5.840 0~58.380 0 μg · mL⁻¹)。

收稿日期: 2020-02-27

基金项目: 上海市绿化和市容管理局科学技术攻关项目(G152430); 上海植物种质资源工程技术研究中心项目(17DZ2252700)

作者简介: 周施雨(1987—),女,江苏无锡人,硕士,中药师,主要从事药用蕨类植物的研究。

①通信作者 E-mail: daixiling2010@shnu.edu.cn

称取阴地蕨全草粉末 20 g, 采用水提醇沉法^[11]提取粗多糖。将阴地蕨粗多糖配制质量浓度 $0.511 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 待测溶液, 同法测定波长 490 nm 处吸光度, 并根据葡萄糖标准曲线计算多糖含量。

1.2.2 抑菌圈直径和最小抑菌浓度(MIC)测定 大肠杆菌菌液解冻后接种在无菌 LB 培养液中, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中振荡培养 24 h, 用无菌 LB 培养液稀释成 $6 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌液, 待用。刮取金黄色葡萄球菌菌苔, 接种在无菌 TSB 培养液中, 在培养液中加入适量的质量体积分数 0.9% NaCl 溶液, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中静置培养 24 h, 用无菌 TSB 培养液稀释至 $6 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌液, 待用。采用纸片扩散法^[12]分别制备含大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的平板。

配制质量浓度分别为 0.412、1.648 和 $6.592 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的粗多糖无菌溶液, 分别吸取 20 μL 滴于 6 块平板的滤纸片上, 并以质量浓度相同的卡那霉素作为各自的阳性对照, 以无菌超纯水作为空白对照; 将培养皿置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h, 观察并采用直尺(精度 1 mm)测量抑菌圈直径。实验重复 3 次。

配制质量浓度分别为 0.103、0.206、0.309、0.412 和 $0.515 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的粗多糖无菌溶液, 采用上述方法观察并测量抑菌圈直径, 确定 MIC 值^[13]。实验重复 3 次。

1.2.3 肿瘤细胞相对存活率测定 配制含质量体积分数 10% 胎牛血清和质量体积分数 1% 青霉素-链霉素的 DEME 培养液, 并接种 A-549 和 HeLa 细胞, 然后置于体积分数 5% CO_2 、温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、饱和湿度的细胞培养箱中培养, 每 2 d 更换 1 次细胞培养液并进行传代。分别取对数生长期的 A-549 和 HeLa 细胞, 按最佳铺板密度接种 100 μL 细胞悬液至 96 孔培养板中, 分别加入质量浓度 4.120、8.240、16.480、32.960 和 $65.920 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 粗多糖溶液, 阳性对照组加入质量浓度相同的喜树碱, 空白对照组不加粗多糖溶液, 本底组不接种细胞; 将培养板置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养 48 h; 然后每孔加入质量浓度 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 20 μL , 继续培养 4 h 后加入 100 μL 三联液(包含体积分数 10% SDS、体积分数 5% 异丁醇和 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养过夜; 培养结束后用全波长式微孔板酶标仪(瑞士 Tecan 公司)测定波长 570 nm 处吸光度(OD), 根据公式“相对存活率 = $[(\text{OD}_{\text{样品组}} - \text{OD}_{\text{本底组}}) / \text{OD}_{\text{空白对照组}}] \times 100\%$ ”计算各组肿瘤细胞的相对存活率。实验重复 3 次。

1.3 数据处理和分析

使用 predict 函数进行点估计, 取 95% 置信区间构造区间估计, 分别估算阴地蕨粗多糖对 A-549 和 HeLa 细胞的半抑制浓度(IC_{50})。采用 R 软件进行数据处理。

2 结果和分析

2.1 阴地蕨全草的粗多糖得率及多糖含量

测定结果表明: 阴地蕨全草的粗多糖得率为 7.05%; 粗多

糖中多糖含量为 20.60%, 经过换算可知阴地蕨全草的多糖含量为 1.45%。

2.2 阴地蕨粗多糖的抑菌作用

不同质量浓度阴地蕨粗多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径见表 1。结果表明: 阴地蕨粗多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有一定的抑制作用, 且对大肠杆菌的抑制作用略强于金黄色葡萄球菌; 随着粗多糖质量浓度的提高, 抑菌圈直径均逐渐增大, 表明阴地蕨粗多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用具有一定的浓度依赖性; 当粗多糖质量浓度达到 $6.592 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌作用最强。此外, 阴地蕨粗多糖的抑菌作用明显小于质量浓度相同的卡那霉素(阳性对照)。

进一步测定结果表明: 阴地蕨粗多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度分别为 0.206 和 $0.309 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明阴地蕨粗多糖对于大肠杆菌的抑制作用优于金黄色葡萄球菌。

表 1 阴地蕨粗多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径¹⁾
Table 1 Inhibitory zone diameter of crude polysaccharides from *Botrychium ternatum* (Thunb.) Sw. to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*¹⁾

处理组 Treatment group	质量 浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ Mass concentration	抑菌圈直径/mm Inhibitory zone diameter	
		大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
T1	0.412	6.5	6.5
CK1	0.412	10.0	9.0
T2	1.648	7.5	7.0
CK2	1.648	24.6	21.0
T3	6.592	9.0	8.5
CK3	6.592	34.2	32.0
CK	0.000	—	—

¹⁾ T1, T2, T3: 阴地蕨粗多糖 Crude polysaccharides from *Botrychium ternatum* (Thunb.) Sw.; CK1, CK2, CK3: 阳性对照(卡那霉素) The positive control (kanamycin); CK: 空白对照(超纯水) The blank control (ultrapure water)。—: 无抑菌作用 No bacteriostasis.

2.3 阴地蕨粗多糖对肿瘤细胞增殖的抑制作用

经不同质量浓度阴地蕨粗多糖处理后 A-549 和 HeLa 细胞的相对存活率见表 2。结果表明: 随着阴地蕨粗多糖质量浓度的提高, A-549 和 HeLa 细胞的相对存活率均逐渐降低, 当粗多糖质量浓度达到 $65.920 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, A-549 和 HeLa 细胞的相对存活率分别为 62.20% 和 65.80%, 表明阴地蕨粗多糖质量浓度越高, 对 A-549 和 HeLa 细胞增殖的抑制作用越强, 呈现一定的浓度依赖性。此外, 阴地蕨粗多糖对 A-549 和 HeLa 细胞增殖的抑制作用明显小于质量浓度相同的喜树碱(阳性对照)。

predict 函数计算结果显示: 阴地蕨粗多糖浓度与 A-549 和 HeLa 细胞的相对存活率呈良好的线性关系, 线性方程分别为 $Y = 445.6824 - 6.1339X$ ($R^2 = 0.9845$) 和 $Y = 240.2217 - 2.6197X$ ($R^2 = 0.9803$); 阴地蕨粗多糖对 A-549 和 HeLa 细胞

的半抑制浓度分别为 138.90 和 109.23 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此可知,阴地蕨粗多糖对 HeLa 细胞增殖的抑制作用略强于 A-549 细胞,且 HeLa 细胞对阴地蕨粗多糖的浓度变化更敏感。

表 2 经不同质量浓度阴地蕨粗多糖处理后 A-549 和 HeLa 细胞的相对存活率 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 Relative survival ratio of A-549 and HeLa cells treated by crude polysaccharides from *Botrychium ternatum* (Thunb.) Sw. at different mass concentrations ($\bar{X} \pm SD$)

处理组 ¹⁾ Treatment group ¹⁾	质量 浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Mass concentration	肿瘤细胞的相对存活率/% Relative survival ratio of tumor cells	
		A-549	HeLa
T1	4.120	72.30±2.02	89.16±0.73
CK1	4.120	4.93±1.02	42.52±0.58
T2	8.240	71.65±0.84	87.94±2.79
CK2	8.240	3.43±0.50	31.57±0.68
T3	16.480	69.11±0.58	85.39±5.76
CK3	16.480	2.56±0.27	24.38±0.44
T4	32.960	67.21±0.29	81.44±7.65
CK4	32.960	1.72±0.15	20.68±0.34
T5	65.920	62.20±0.33	65.80±2.54
CK5	65.920	0.61±0.52	16.88±0.27

¹⁾T1,T2,T3,T4,T5: 阴地蕨粗多糖 Crude polysaccharides from *Botrychium ternatum* (Thunb.) Sw.; CK1,CK2,CK3,CK4,CK5: 阳性对照(喜树碱)The positive control (camptothecin).

3 讨论和结论

阴地蕨全草的多糖含量达 1.45%,接近欧洲蕨 [*Pteridium aquilinum* (Linn.) Kuhn] 全草的多糖含量,但高于乌蕨 [*Stenoloma chusana* (Linn.) Ching]、华南毛蕨 [*Cyclosorus parasiticus* (L.) Farwell.] 和井栏边草 [*Pteris multifida* Poir.] 等蕨类植物全草的多糖含量^[2]。乌蕨、蜈蚣蕨 (*Pteris vittata* Linn.) 和华南毛蕨等蕨类植物的多糖对大肠杆菌、变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 和金黄色葡萄球菌均具有抑制作用^[2],而阴地蕨粗多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌也有一定的抑制作用,说明蕨类植物多糖具有广谱抗菌效果。阴地蕨粗多糖对大肠杆菌的抑制效果强于金黄色葡萄球菌,因而,可初步判断阴地蕨粗多糖对革兰氏阴性菌的抑制效果更强,这也佐证了阴地蕨对肠炎病原菌具有明显的抑制效果^[3]。阴地蕨粗多糖对 A-549 和 HeLa 细胞的增殖均有一定的抑制作用;从半抑制浓度看,阴地蕨粗多糖对 HeLa 细胞增殖的抑制作用强于 A-549 细胞,且 HeLa 细胞对阴地蕨粗多糖的浓度变化更敏感。

研究结果表明:阴地蕨粗多糖的抑菌和抑制肿瘤细胞增殖的作用均呈现一定的浓度依赖性,且均随其质量浓度提高而增强,但均明显小于各自的阳性对照,说明虽然阴地蕨粗多糖呈现出一定的抑菌和抑制肿瘤细胞增殖的活性,但其药用疗效的开发有待更加科学深入的研究。

参考文献:

- [1] 王玲,和兆荣. 药用蕨类植物化学成分研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(3): 1-4.
- [2] 许柑叶,郑怡,陈晓清. 8种蕨类植物多糖提取物抑菌效果的研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2005, 21(2): 99-102.
- [3] 陈晓清,陈郑斌. 半边旗和阴地蕨粗多糖抗鱼病原菌活性初步研究[J]. 亚热带植物科学, 2009, 38(2): 48-50.
- [4] 赵俊华,赵能武,王培善,等. 土家药黔产铁线蕨、阴地蕨科药用植物的种类和分布研究[J]. 中国民族医药杂志, 2008(5): 44-46.
- [5] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1362-1363.
- [6] 吴帅,李懿宸,张思嫔,等. 阴地蕨、银粉背蕨总黄酮和总酚含量及其抗氧化能力分析[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2018, 47(6): 734-743.
- [7] RAO V S N, SANTORS F A, SOBREIRA T T, et al. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa* [J]. *Planta Medica*, 1997, 63: 146-149.
- [8] SOUZA M F, TOME A R, RAO V S N. Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1999, 51: 125-129.
- [9] 曹剑锋,任朝辉,罗春丽,等. 阴地蕨多糖提取工艺及抗肿瘤活性测定研究[J]. 现代农业科技, 2016(15): 261-262, 269.
- [10] 王文平,郭祀远,李琳,等. 苯酚-硫酸法测定野木瓜中多糖含量的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 276-279.
- [11] 杨林,刘翠花,刘刚,等. 西藏野生荨麻水溶性多糖提取工艺的优化设计[J]. 食品工业, 2013, 34(2): 35-37.
- [12] 庄惠如,吴文珊,卢海声,等. 福建福州 25 种蕨类植物抑菌活性筛选研究[J]. 亚热带植物通讯, 2000, 29(1): 5-8.
- [13] 陈明,段萍,陈金秀. 乌蕨与黄连、黄芩、穿心莲抗菌活性的比较[J]. 右江民族医学院学报, 2001, 23(4): 523-524.

(责任编辑:郭严冬)